

ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE DAS PROTEINAS DO LIQUIDO CEFALORRAQUEANO

VALORES NORMAIS

IZELINO CALDAS FILHO *
GILBERTO BELISARIO CAMPOS **
CARLOS F. HOMEM PITTELLA ***

A necessidade de um método qualitativo para dosar as proteínas do líquido cefalorraqueano (LCR) surgiu com a punção lombar. As técnicas propostas foram, no início, as de precipitação coloidal e, apesar de estudos cuidadosos e repetidos, tornava-se difícil a interpretação físico-química dos resultados obtidos o que levava às mais variadas discussões¹⁷. Estes métodos tiveram sua utilidade pois provaram a existência de alterações qualitativas nas proteínas líquóricas em pacientes acometidos por várias síndromes neurológicas.

Há extensa bibliografia evidenciando que as diversas técnicas laboratoriais empregadas determinaram o aparecimento dos mais diversos tipos de reações coloidais e mostrando a existência de alterações qualitativas, antes que quantitativas, conforme Sry e col. (1931)²⁷ e Yde (1934, 1937)^{30, 31} que tentaram separar as frações protéicas líquóricas. Yde chegou a mostrar um aumento das globulinas na paralisia geral progressiva e em tumores cerebrais. Ujsaghi (1941), Epstein (1947) e Abelin e Lehmann (citados por A. Lowenthal¹⁷) mostraram que existem diferenças nas frações protéicas de diversos líquidos corporais, sendo os primeiros a levantar a questão prática que *um LCR pode ter um teor de proteína em mg% dentro de limites normais, isto é, normal quantitativamente, e estar alterado qualitativamente*. Isto equivale a dizer que um teor de proteína de 27 mg%, considerado como sendo normal¹ não exclue uma patologia do sistema nervoso.

Em 1939, Tiselius (citado por A. Lowenthal¹⁷) conseguiu, pela eletroforese, separar frações protéicas do LCR. Em 1942 Kabat e col.^{13, 14} verificaram um aumento de gama-globulina no soro e LCR de pacientes com mieloma múltiplo e no LCR na esclerose múltipla e na sífilis. Para Scheid e col.¹⁹, em 1944, as frações eletroforéticas do LCR eram semelhantes às do soro nas doenças de Guillain-Barré, poliomielite, meningites e tumores cerebrais. Em 1949, 1950 e 1951 Booij^{3, 4, 5} não encontrou gama-globulina em LCR normal; estabeleceu que a albumina estava presente em todos os casos estudados e que a beta-globulina estava aumentada em síndromes inflamatórias e que estas seriam formadas no próprio sistema nervoso central. Cervos-Navarro e Matiar (1959)⁸ e Habeck

Serviço de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG:
* Ex-residente; ** Chefe do Departamento de Neurologia e Psiquiatria; *** Chefe do Serviço de Patologia Clínica da Fundação Benjamim Guimarães, Belo Horizonte MG.

(1960), citados por A. Lowenthal¹⁷, tentaram sem sucesso estabelecer correlação entre resultados obtidos por eletroforese de proteínas do LCR e quadros sintomatológicos neurológicos. Wender (1959) (citado por A. Lowenthal¹⁷) mediante eletroforese, estudou as modificações de proteínas séricas em afecções neurológicas. Em nosso meio, Spina-França (1959)²³ relatou os principais resultados encontrados na literatura; em 1960 e 1961, estudando 30 amostras de LCR e 30 amostras de soro sanguíneo mediante eletroforese de proteínas em papel (EF.P), mencionou a fração tau, já descrita por outros autores, associando-a aos valores encontrados para a beta-globulina^{24, 25}. Lowenthal¹⁷ em 800 amostras de pacientes neurologicamente normais mostrou a existência da pré-albumina, albumina, cinco frações alfa, três frações beta e nove frações gama-globulínicas, não valorizando para fins práticos, muitas das frações encontradas. Kaplan e Johnstone (1966)¹⁵ compararam vários métodos de concentração e usaram o acetato de celulose. Kaplan (1967)¹⁶ publicou trabalho mostrando os níveis encontrados mediante ultracentrifugação, como método de concentração das proteínas do LCR. Castello⁷ estudou 10 pacientes normais e 100 pacientes com diagnósticos seguros, mediante eletroforese, opinando pela validade deste exame como rotina e valorizando sua expressividade em relação às alterações das gama-globulinas. Em 1971, Sherwin e Moore²¹ descreveram um método eletroforético não exigindo concentração do LCR e usando um corante diferente do usual, a nigrosina; analisaram 300 pacientes e ressaltaram o valor de sua técnica; descreveram apenas as frações albumina, globulina-alfa, globulina-beta e globulina-gama, desvalorizando a fração tau. Hordynsky (1972)¹² em 1000 pessoas normais, contrapondo-se ao trabalho anterior, procurou estabelecer os valores das frações alfa¹, alfa² e tau.

A metodologia empregada varia no que se refere à forma de concentrar as proteínas e ao uso do suporte para a obtenção da separação das frações. Para a concentração existem os seguintes meios: 1) diálise contra substância macromolecular (polivinilpirrolidona) empregada por Kaplan e Johnstone¹⁵, por Spina-França^{24, 25} e por nós; 2) precipitação, utilizada por Lowenthal¹⁷; 3) liofilização; 4) ultracentrifugação sob altas pressões de nitrogênio; 5) ultracentrifugação a vácuo, usada por Kaplan¹⁶. Ao que parece, este último método de concentração protéica é o melhor^{6, 12, 15, 16}. No entanto, já há autores como Sherwin e Moore²¹ que fazem a eletroforese usando quantidades mínimas de LCR, sem concentrá-lo²¹. Quanto ao suporte, os autores mencionados utilizaram papel (Spina-França²⁴), agar-gel (Lowenthal¹⁷), acetato de celulose (Kaplan^{15, 16} e Sherwin e Moore²¹). Sabemos hoje que os métodos empregados na concentração das proteínas do LCR e na eletroforese modificam percentualmente as diversas frações^{12, 17, 21} motivo pelo qual é importante conhecer que metodologia foi empregada quando se vai interpretar resultados.

A eletroforese trouxe novas informações, algumas de difícil interpretação²⁰, que podem muitas vezes auxiliar na elucidação diagnóstica. Acreditando que o LCR deva ser analisado valorizando não só o teor protéico quantitativo, mas também o qualitativo, propusemo-nos a estudá-lo verificando neste trabalho, suas variações normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos o LCR de 19 pessoas entre 10 e 54 anos de idade, sendo 12 do sexo masculino e 7 do sexo feminino, 13 brancas, 5 pardas e um melanodérmico. Nenhuma apresentava sintomas ou sinais de comprometimento orgânico do SNC. Obtivemos o LCR mediante punção lombar, sendo normais os resultados quanto à pressão, aspecto, citologia, dosagem de glicose e de cloretos; em todos a reação de Pandy era negativa. Em 9 casos a reação de Wassermann foi negativa, em 3 a reação do VDRL foi negativa para sífilis, em 10 a reação de Weinberg foi negativa.

A proteinorraquia total foi determinada pelo método de Meulemans (ácido sulfosalicílico a 3% em sulfato de sódio a 7%, na proporção de 1 ml LCR para 3 ml do reagente). Optamos pela dosagem por este método por ser o mesmo bastante seguro e por já ter sido apresentado como método de escolha para a dosagem das proteínas do LCR^{16, 18} diferentemente da metodologia empregada por alguns outros autores^{17, 21, 24, 26}.

Para concentrar as proteínas o LCR foi dialisado usando-se uma solução isotônica de polivinilpirrolidona a 30% durante, no mínimo, 12 horas, a 40°C. A quantidade de LCR colocada para dialisar foi inversamente proporcional à quantidade de proteína encontrada em cada amostra. O concentrado obtido foi ressuspensão em cerca de 20 microlitros do próprio LCR ou de solução tampão (veronal sódico 8,24 g/litro, pH-8,6 e força iônica de 0,05).

Como suporte usamos o acetato de celulose gelatinizado*. Aplicamos, a 2 cm do polo negativo, cerca de 9 a 12 microlitros do LCR concentrado. Depois de aplicada uma corrente de 220 volts durante 50 minutos as fitas foram coradas com uma solução de Ponceau S 0,5 g% em ácido tricloro-acético a 5%. Em seguida procedia-se à eluição da mesma em ácido acético a 80%, fazendo a leitura de cada fração eluída separadamente em fotocolorímetro.

RESULTADOS

Nossos resultados encontram-se tabela 1: a proteinorraquia total média foi de 18 mg% variando de 10 a 28 mg%; reação para globulinas pelo método de Pandy foi negativa em todos os pacientes. As frações evidenciadas pela EFP com seus respectivos valores figuram na tabela 2.

COMENTARIOS

É difícil escolher material para estabelecer padrões normais e a escolha de determinados padrões está sempre sujeita a críticas. Dando preferência a material proveniente de pessoas sadias conseguimos amostras de 7 pacientes normais (casos 1 a 7) e 12 pacientes com neuroses (casos 8 a 19). Neste último grupo temos seguido alguns já por um espaço de dois anos. Não tem sido relatadas alterações nos perfis eletroforéticos de pessoas com neuroses, motivo pelo qual os incluímos em nosso grupo de pessoas normais, procedimento que já vem sendo adotado por autores como Tanaka²³, Bélanger e Martin² e Spina-França^{24, 25}.

Spina-França²⁴ cita Widell o qual faz delimitação etária entre 15 e 45 anos de idade para o grupo controle, procedimento que não levamos em consideração. Nosso número de casos é pequeno para se tentar estabelecer correlação entre idade, sexo, cor e os resultados obtidos.

Existem diferenças entre as dosagens de proteínas do LCR ventricular, cisternal e lombar. Para alguns autores esta diferença não é significativa quando

* Celogel.

Caso	Idade	Cor	Sexo	Proteínas totais (mg%)
1	10	P	M	15
2	24	B	M	18
3	54	M	F	22
4	17	P	F	18
5	35	B	F	21
6	35	P	M	18
7	14	B	M	23
8	18	B	M	18
9	14	B	M	18
10	40	B	F	28
11	31	B	M	18
12	24	P	F	10
13	21	B	M	21
14	21	B	M	20
15	17	B	M	15
16	24	B	M	18
17	28	P	M	27
18	16	B	F	16
19	31	B	F	20
Médias	25			18

Tabela 1 — Proteínas totais, em mg%, dosadas pelo método de Meulemans, em 19 pacientes: M = melanodérmico, P = pardo, B = branco; idade em anos. A reação de Pandy foi negativa em todos os casos.

Caso	Pré-albumina	Albumina	Globulinas			
			α_1	α_2	β	δ
1	4.6	58.6	3.3	4.3	17.1	12.1
2	6.2	65.9	4.5	4.5	08.9	10.0
3	3.0	57.0	5.0	8.0	16.0	11.0
4	4.0	52.0	8.0	10.0	14.0	12.0
5	3.0	57.0	5.0	8.0	16.0	11.0
6	3.0	56.0	7.0	7.0	17.0	10.0
7	3.0	53.0	9.0	10.0	15.0	10.0
8	3.0	56.0	6.0	7.0	17.0	11.0
9	3.0	55.0	6.0	8.0	16.0	12.0
10	5.0	51.0	6.0	9.0	17.0	12.0
11	3.0	56.0	6.0	9.0	16.0	10.0
12	4.0	54.0	5.0	9.0	16.5	11.5
13	4.0	52.0	6.0	9.0	17.0	12.0
14	3.0	56.0	5.0	8.0	16.0	12.0
15	6.0	52.0	7.0	9.0	15.0	11.0
16	5.5	53.0	6.0	8.0	16.0	11.5
17	6.0	47.0	8.0	12.0	15.0	12.0
18	8.0	48.0	8.0	9.0	16.0	11.0
19	4.0	57.0	5.0	8.0	14.0	12.0
Médias	4.3	54.8	5.9	8.3	15.5	11.2

Tabela 2 — Teores relativos (%) das frações protéicas de 19 amostras de LCR e as médias correspondentes.

o resultado é expresso percentualmente²⁴. Grande parte dos autores usa, contudo, LCR lombar (Lowenthal¹⁷, Kaplan e Johnstone¹⁵, Kaplan¹⁶). Nossos resultados referem-se a LCR colhidos exclusivamente por via lombar.

Apesar de já terem sido descritos 36 diferentes componentes protéicos do LCR (Toole²⁹), pelo método que empregamos e para efeitos práticos, separamos seis frações: a *pré-albumina* é a fração mais baixa; alguns descrevem-na como sendo duas²⁹ e outros como ausente²¹; para a maioria dos autores é uma fração presente no LCR; a *albumina* é a fração mais alta, percentualmente; as *alfa-globulinas* 1 e 2 que, para alguns autores são, na realidade, 3 frações²⁹ e para outros 5¹⁷; há quem as considere como fração única²¹; as *beta-globulinas*, mostrando acentuada estabilidade e que, segundo Clausen (1961)⁹, são as globulinas específicas do SNC, fato já admitido por Booij (1949)³. Não encontramos a fração táu mencionada por Spina-França^{24, 25} e Hordynsky¹² entre outros autores; as *gama-globulinas*, fração que vem recebendo muita atenção dos estudiosos⁷.

Deve-se salientar que, no LCR, a fração beta é 1,5 vezes maior que a fração gama, podendo chegar, percentualmente, a ter duas vezes o valor da gama, fato salientado por Hanzal e Vymazal¹¹ e Toole²⁹, enquanto no soro ela é a maior fração globulínica.

Normalmente não se encontra fibrinogênio no LCR²⁹.

As frações IgG e IgA podem ser encontradas tanto na fração beta como na gama²⁹.

Nossos resultados diferem de algumas citados na literatura, mas são próximos aos publicados por Spina-França^{24, 25}, principalmente no que se refere à albumina, globulinas alfa e gama. Deve-se, porém, salientar dois fatos: 1º) que o autor em questão não usa LCR lombar que foi por nós usado; 2º) que apesar do mesmo fazer a concentração protéica usando o mesmo processo adotado por nós, ele utilizou nos trabalhos mencionados a EFP em papel e nós usamos o gel de acetato de celulose. Outro autor a ser considerado é Lowenthal¹⁷ que, dispondo de boas condições técnicas, obtém as frações de modo diferente ao empregado por nós por concentrar as proteínas por método de precipitação com suporte de agargel. Na tabela 3, para ilustração estão os valores encontrados por este autor. Já Kaplan¹⁶ usa acetato de celulose como suporte, mas faz a concentração protéica por ultracentrifugação a vácuo, procedimento que ainda não tivemos oportunidade de usar.

Em conclusão, o perfil eletroforético das proteínas do LCR, usando para concentração uma solução de polivinilpirrolidona a 30% e, como suporte, fitas de acetato de celulose, evidenciou a presença de seis frações protéicas cujas médias foram: pré-albumina 4.3%; albumina 54.8%; globulina alfa-1 5.9%; globulina alfa-2 8.3%; globulinas beta 15.5%; globulinas gama 11.2%.

RESUMO

Foi feita eletroforese das proteínas de LCR colhido por via lombar de 19 pacientes neurologicamente normais entre 10 e 54 anos. A proteinorraquia total

Ano	Autores	Pré-Albumina (%)	Albumina (%)	Globulinas (%)			
				α_1	α_2	β	δ
1952	Esser 10	1.2	56.1	4.7	7.5	24.1	6.4
1954	Schönenberg 22	—	58.7	7.7	9.9	12.9	10.9
1958	Bélangier & Martin 2	3.4	57.7	4.9	7.5	18.1	10.1
1958	Hanzal & Vymazal 11	2.9	59.8	4.5	5.6	17.4	8.8
1960	Spina-França 24	2.2	51.6	5.0	8.7	21.6*	10.9
1964	Lowenthal 17	1.5—3.9	60.0—65.9	4.0—7.9	5.0—7.9	16.0—25.8	7.0—11.9
1966	Kaplan & Johnstone 15	4.9	61.5	4.5	6.7	13.7	8.8
1972	Hordynsky 12	1.4—5.4	48.0—62.0	8.5—9.0	6.2—9.6	12.2—18.8	7.0—12.6
1974	Presentes autores	4.3	54.8	5.9	8.3	15.5	11.2

Tabela 3 — Valores das frações proteicas do líquido cefalorraquiano, segundo vários autores. Autores 2,10,11,15,22,24 e nós utilizando valores médios; autores 12,17 utilizando valores mínimos e máximos; * == incluída a fração tau.

variou entre 10 e 28 mg% (método de Meulemans). Sete pacientes eram normais e 12 apresentavam neuroses. As médias das frações separadas pela eletroforese foram: pré-albumina 4.3%; albumina 54.8%; globulina alfa-1 5.9%; globulina alfa-2 8.3%; globulinas beta 15.5%; globulinas gama 11.2%.

SUMMARY

Electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins: normal values

Determinating the total protein contents by the Meulemans method and using strips of cellulose acetate "Cellogel" for electrophoresis the authors have studied the CSF of 19 patients between 10 and 54 years old. Total proteins was found between 10 and 28 mg%. The proteins were separated in six fractions with the following results: pré-albumin 4.3%; albumin 54.8%; α_1 -globulin 5.9%; α_2 globulin 8.3%; β -globulins 15.5% and δ -globulins 11.2%.

REFERENCIAS

1. ABRAMOWICZ, M. — Normal values for CSF protein concentration in children. Clin. Ped. 8:300, 1969.
2. BELANGER, C. & MARTIN, J. L. — Études sur le liquide céphalo-rachidien par l'électrophorèse sur papier: I. Méthodes et valeurs normales. Laval Méd. 26:622, 1958.
3. BOOIJ, J. — Electrophoresis in CSF proteins. Folia Psychiat. neerl. 52:247, 1949.
4. BOOIJ, J. — Electrophoresis in CSF proteins. Folia Psychiat. neerl. 53:502, 1950.
5. BOOIJ, J. — Electrophoresis in CSF proteins (gama-globulins in particular). Folia Psychiat. neerl. 55:1, 1952.
6. BURROWS, S. — A simple method for concentration of CSF for protein electrophoresis. Clin. Chem. 2:937, 1965.
7. CASTELLO, C. J. — La patologia de las proteínas del líquido cefalorraquídeo: su estudio mediante la electroforesis sobre gel de agar-agar. Arch. Neurobiol. (Madrid) 32:655, 1969.
8. CERVOS-NAVARRO, J. & MATIAR, J. — Zur Frage der Intrathekalen Regulation und Genese der Liquorproteine. Dtsch. Z. Nervenheilk. 176:614, 1969.
9. CLAUSEN, J. — Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107:170, 1961.
10. ESSER, H. — Die elektrophoretische Untersuchung der Liquoreiweisskörper und ihre klinische Bedeutung. Münch. med. Wschr. 94:2313, 1952.
11. HANZAL, F. & VYMAZAL, J. — The significance of electrophoretic investigation in inflammatory diseases of the nervous system. Acta Psychiat. Neurol. Scand. 33:283, 1958.
12. HORDYNSKY, W. E. — Importance of pre-albumin, alpha 1, alpha 2 and tau fractions in cerebrospinal fluid. Amer. J. Clin. Pathol. 57:251, 1972.
13. KABAT, E. A.; LANDOW, H. & MOORE, D. H. — CSF electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. 49:260, 1942.
14. KABAT, E. A.; MOORE, D. H. & LANDOW, H. — Electrophoretic study of proteins in CSF and their relationship to the serum proteins. J. Clin. Inv. 21:571, 1942.
15. KAPLAN, A. & JOHNSTONE, M. — Concentration of CSF proteins and their fractionation by cellulose acetate electrophoresis. Clin. Chem. 12:717, 1966.

16. KAPLAN, A. — Electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. *Am. J. Med. Sciences.* 253:549, 1967.
17. LOWENTHAL, A. — Agar Gel Electrophoresis in Neurology. Elsevier Publishing Co., New York, 1964.
18. PENNOCK, C. A.; PASSANT, L. P. & BOLTON, F. G. — Estimation of cerebrospinal fluid protein. *J. Clin. Path.* 21:518, 1968.
19. SCHEID, K. F. & SCHEID, L. — Elektrophoretische Trennung der Eiweisskörper in Liquor cerebrospinalis. *Arch. Psychiat. Nervenk.* 117:219, 312 e 641, 1944.
20. SCHULLER, E. — The current state over research on CSF protein. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 30:297, 1972.
21. SHERWIN, R. S. & MOORE, G. H. — Microzone electrophoresis of unconcentrated cerebrospinal fluid using cellulose acetate strips and nigrosin dye. *Amer. J. Clin. Path.* 55:705, 1971.
22. SCHÖNENBERG, H. — Die Papier Elektrophorese der Liquor cerebrospinalis. *Ann Paediat. (Basilea)* 183:309, 1954.
23. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do LCR; principais resultados encontrados na literatura. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 16:223, 1958.
24. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do LCR: valores normais. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 18:19, 1960.
25. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraqueano. *Rev. paul. Med.* 59:420, 1961.
26. SPINA-FRANÇA, A.; LUZ, B. R. & HAUSSEN, S. R. — Proteinograma do líquido cefalorraqueano do recém-nascido normal. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 32:212, 1974.
27. STARY, Z.; WINTERNITZ, R. & KRAL, A. — Untersuchungen über den Eiweissgehalt der Liquor cerebrospinalis. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 132:193, 1931.
28. TANAKA, Z. — Electrophoretic study of CSF components: survey in normal liquor. *Tohoku J. Exp. Med. (Sendai)* 63:245, 1956.
29. TOOLE, J. F. — *Special Techniques for Neurologic Diagnosis.* F. A. Davis Co. Philadelphia, 1970.
30. YDE, A. — Das Verhältnis zwischen Globulin and Albumin Menge in de Cerebrospinalflüssigkeit. *Acta Psychiat. scand.* 9:187, 1934.
31. YDE, A. — Einige Untersuchungen über die Proteinsysteme der Cerebrospinalflüssigkeit. *Acta Psychiat. scand.* 12:257, 1937.